

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 28 NOV 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 98T3-10PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04341	国際出願日 (日.月.年) 11.08.99	優先日 (日.月.年) 11.08.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/11, C12Q1/68		
出願人(氏名又は名称) アサヒビール株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.02.00	国際予備審査報告を作成した日 08.11.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 六笠 紀子 印	4B 9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |   |       |        |                       |
|-------------------------------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| 明細書                                 | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 明細書                                 | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
|                                     |   |       |        |                       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの           |
| 請求の範囲                               | 第 | _____ | 項、     | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| 請求の範囲                               | 第 | _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 請求の範囲                               | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
|                                     |   |       |        |                       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの           |
| 図面                                  | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 図面                                  | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
|                                     |   |       |        |                       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| 明細書の配列表の部分                          | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| 明細書の配列表の部分                          | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	1-12	有
請求の範囲		無

進歩性(IS)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-12	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-12	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: LUDWIG, W. et al. "Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov.", International J. of Systematic Bacteriol. (1990) 第40巻, 第1号 p. 19-27

引用文献2: LUDWIG, W. et al. "Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content", System. Appl. Microbiol. (1992) 第15巻, 第4号 p. 487-501

引用文献3: JP, 6-98800, A(寶酒造株式会社) 12. 4月. 1994(12. 04. 94)

引用文献1には、ペクチネータス・フリシゲンシスの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が記載されている。

引用文献2には、ペクチネータス・フリシゲンシスの23SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が記載されている。

引用文献3には、16SリボソームRNA遺伝子と23SリボソームRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子が微生物種に特異的な遺伝子配列を有することを利用して、微生物を感度良く検出する方法が記載されている。

ここで、引用文献3に記載されたように微生物を特異的に検出するために、引用文献1及び引用文献2に記載されたペクチネータス・フリシゲンシスの16S及び23SリボソームRNA遺伝子配列を用いて、スペーサー領域の遺伝子の配列を決定すること、このようにして決定した配列の適当な部分をプライマーとして選択し、遺伝子増幅法によりペクチネータス・フリシゲンシスを検出することは当業者が容易に想到し得たものと認める。

また、配列を決定する際に特別の困難性があるものとも認められない。

従って、請求の範囲1乃至12に係る発明は引用文献1乃至3の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 04 April 2000 (04.04.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/04341	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 98T3-10PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 11 August 1999 (11.08.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 11 August 1998 (11.08.98)
<b>Applicant</b> MOTOYAMA, Yasuo et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 February 2000 (18.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b>  R. Forax  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------

PCT



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 98T3-10PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04341	国際出願日 (日.月.年) 11.08.99	優先日 (日.月.年) 11.08.98
出願人(氏名又は名称) アサヒビール株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),  
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LUDWIG, W. et al. "Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of <i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> and description of <i>Pectinatus frisingensis</i> sp. nov., <i>Selenomonas lacticifex</i> sp. nov., <i>Zymophilus raffinivorans</i> gen. nov., sp. nov., and <i>Zymophilus paucivorans</i> sp. nov.", International J. of Systematic Bacteriol. (1990) 第40巻, 第1号 p. 19-27	1-12
Y	LUDWIG, W. et al. "Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content", System. Appl. Microbiol. (1992) 第15巻, 第4号 p. 487-501	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 11. 99

国際調査報告の発送日

16.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9 7 3 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 5-504889, A (エヌ・ベー・イノヘネテイクス・エス・アー) 29. 7月. 1993 (29. 07. 93) &WO, 9116454, A &EP, 525095, A1 &AU, 9177550, A &US, 5536638, A	1-12
Y	JP, 7-51100, A (寶酒造株式会社) 28. 2月. 1995 (28. 02. 95) パテントファミリーなし	1-12
Y	JP, 6-90793, A (寶酒造株式会社) 5. 4月. 1994 (05. 04. 94) パテントファミリーなし	1-12
Y	JP, 6-98800, A (寶酒造株式会社) 12. 4月. 1994 (12. 04. 94) パテントファミリーなし	1-12

091762633  
7T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED

JUL 02 2001

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference 98T3-10PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04341	International filing date (day/month/year) 11 August 1999 (11.08.99)	Priority date (day/month/year) 11 August 1998 (11.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/11, C12Q 1/68		
Applicant ASAHI BREWERIES, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 18 February 2000 (18.02.00)	Date of completion of this report 08 November 2000 (08.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04341

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04341

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: Ludwig, W. et al., "Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov.," International J. of Systematic Bacteriol. (1990), Vol. 40, No. 1, pages 19-27

Document 2: Ludwig, W. et al., "Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content," System. Appl. Microbiol. (1992), Vol. 15, No. 4, pages 487-501

Document 3: JP, 6-98800, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 12 April, 1994 (12.04.94)

Document 1 describes the base sequence of the 16S ribosomal RNA gene of *Pectinatus frisingensis*.

Document 2 describes the base sequence of the 23S ribosomal RNA gene of *Pectinatus frisingensis*.

Document 3 describes a method of detecting a microbe with high sensitivity, by applying the fact that the gene in the spacer region formed between the 16S ribosomal RNA gene and 23S ribosomal RNA gene has a gene sequence specific to a microbe species.

It could have been easily conceived by a person skilled in the art, to decide the sequence of a gene in a spacer region using the 16S and 23S ribosomal RNA gene sequences of *Pectinatus frisingensis* described in documents 1 and 2 for specifically detecting a microbe as described in document 3, and to select an adequate portion of the sequence decided like this as a primer, for detecting *Pectinatus frisingensis* using a gene amplification method.

Furthermore, it is not considered that there is any special difficulty in deciding a sequence.

So, a person skilled in the art could have conceived of the subject matters of claims 1-12 based on the descriptions of documents 1-3.

01-H

世界知的所有権機関  
国際事務局



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/09683</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月24日(24.02.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04341</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月11日(11.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/227177 1998年8月11日(11.08.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国において) アサヒビール株式会社(ASAHI BREWERIES, LTD.)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋3丁目7番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 本山靖朗(MOTOYAMA, Yasuo)(JP/JP) ✓ 尾形智夫(OGATA, Tomoo)(JP/JP) ✓ 坂井和久(SAKAI, Kazuhisa)(JP/JP) ✓ 〒302-0106 茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサヒビール株式会社 酒類研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 舟橋榮子(FUNAHASHI, Eiko) 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目16番4号 ノアックスビル3階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, CZ, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: GENES FOR DETECTING BACTERIA AND DETECTION METHOD BY USING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 細菌検出のための遺伝子及びそれを用いた検出法</p> <p>(57) Abstract Genes for detecting respectively beer-clouding bacteria belonging to the genus <i>Pectinatus</i>, i.e., <i>P. frisingensis</i> and <i>P. cerevisiiphillus</i> and a method for detecting these bacteria by using these genes. Namely, the gene sequence of the spacer region constructed between 16SrRNA gene and 23SrRNA gene, which are specific to the bacterium belonging to the genus <i>Pectinatus</i> causing beer clouding; and a method for quickly detecting these bacteria at a high sensitivity by using this sequence.</p>		

## (57)要約

本発明は、ビール混濁菌ベクチネータス属菌のベクチネータス・フリシingenシスまたはベクチネータス・セルビシフィラスを検出するための遺伝子及びこれを用いた該菌の検出方法に関し、本発明では、ビール混濁に関係するベクチネータス属菌に特異的な16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間に構成されているスパーサー領域の遺伝子配列を提供し、その配列を用いて迅速に感度よく検出できる方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 細菌検出のための遺伝子及びそれを用いた検出法

## 技術分野

- 5 本発明は、ビール混濁菌ベクチネータス属菌のベクチネータス・フリシンゲンシスまたはベクチネータス・セルビシフィラスを検出するための遺伝子及びこれを用いた該菌の検出方法に関する。

## 背景技術

- 10 ビールを混濁させる微生物（細菌）として、ベクチネータス(*Pectinatus*)属菌が知られている。この属には、ベクチネータス・フリシンゲンシス(*Pectinatus frisingensis*)とベクチネータス・セルビシフィラス(*Pectinatus cerevisiiphilus*)の2種が知られている。ベクチネータス属菌の検出には、増殖培養、分離培養をへて菌を単離しなければならず、少なくとも7日は要する。その後、単離した菌を増殖させ、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験、糖資

- 15 化性など多くの性状試験を行うことにより同定を行っている。これらの多岐にわたる検査は煩雑であり、時間も費用もかかる。また、これら一般に行われている同定試験のほかに、単離した菌からDNAを抽出し、それを膜上あるいは他の支持体上に固定し、標準菌のDNAをプローブとしてハイブリダイゼーション試験を行うことにより菌種を同定する方法がある。しかし、この方法も数日を必要とし、さらに十分な検出感度及び選択性を得るのが難しい。

- 20 そこで、最近では、ベクチネータス属菌に関する検出法として、ベクチネータス・セルビシフィラスに特異的に反応するモノクローナル抗体を使用した検出法(ASBC Journal:51(4)158-163,1993)がある。しかし、本法は検出感度が不十分であるばかりでなく、ベクチネータス・フリシンゲンシスは検出できないという問題があった。

- 25 また、別の検出法として、リボソームRNA遺伝子の多型性を検出するリボタイピング(Ribotyping)法によりベクチネータス・フリシンゲンシスとベクチネータス・セルビシフィラスを検出する方法が報告されている

(J.Am.Soc.Chem.:56(1)19-23,1998)。しかし、本法の適用にあたっては菌の単離操作が必要であることから、検出感度、迅速性に問題があった。

- 30 そこで、さらに迅速な検出法が検討され、最近では、国際公開番号WO 97/20071の開示があり、検体となる微生物のDNAを抽出し、このDNAに相補的なオリゴヌクレオチドをプライマーとして機能させたPCR法を用いたベクチネータスを検出する方法の報告がある。しかしながら、これらの技術に用いられている16SrRNAの塩基配列は微生物の属を越えて類似している場合があり、検出したい特定の微生物以外の微生物も誤って検出してしまうという問題が
- 35 あった。

- 一方、16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子の間に構成されているスペース領域の遺伝子は微生物種に特異的な遺伝子配列を有することが知られており、それを利用した微生物検出法として、醸造論文集 50、22-31 (1995)、APPL. ENVIRON. MICROBIOL. VOL. 62, NO. 5, 1683-1688 (1996)、FEMS MICROBIOL. LETT. VOL. 84, NO. 3, 307-312 (1991)、特開平 6-98800 等があるが、ベクチネータス属菌のスペース領域の遺伝子配列は明らかにされていない。

#### 発明の開示

- そこで、本発明では、ビール混濁に関係するベクチネータス属菌に特異的な16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子の間に構成されているスペース領域の遺伝子配列を提供し、その配列を用いて迅速に感度よく検出できる方法を提供することを目的とする。
- (1) 第1の発明は、配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含むベクチネータス・フリシンゲンシス (*Pectinatus frisingensis*) の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子との間のスペース領域の遺伝子配列である。
- (2) 第2の発明は、配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含むベクチネータス・フリシンゲンシス (*Pectinatus frisingensis*) の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子との間のスペース領域の遺伝子配列である。
- (3) 第3の発明は、配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含むベクチネータス・セルビシフィラス (*Pectinatus cerevisiiphilus*) の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子との間のスペース領域の遺伝子配列である。
- (4) 第4の発明は、配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むベクチネータス・セルビシフィラス (*Pectinatus cerevisiiphilus*) の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子との間のスペース領域の遺伝子配列である。
- (5) 第5の発明は、ベクチネータス・フリシンゲンシス (*Pectinatus frisingensis*) の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子との間のスペース領域の遺伝子配列が以下の配列群、
- 5' - CCATCCTCTTGAAAATCTC - 3' ①  
5' - TCTCRTCTCACAAGTTTGGC - 3' ②
- の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。
- (6) 第6の発明は、ベクチネータス・セルビシフィラス (*Pectinatus cerevisiiphilus*) の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコ

ードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列群、

5' - CACTCTTACAAGTATCTAC - 3' ③

5' - CCACAATATTTCCGACCAGC - 3' ④

5' - AGTCTTCTCTACTGCCATGC - 3' ⑤

- 5 の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(7) 第7の発明は、(1)または(2)に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってベクチネータス・フリシゲンシスを検出する方法である。

- 10 (8) 第8の発明は、(3)または(4)に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってベクチネータス・セルビシフィラスを検出する方法である。

- (9) 第9の発明は、(1)または(2)に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドあるいは(5)に記載されたオリゴヌクレオチドと、ベクチネータス・フリシゲンシスの16SrRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってベクチネータス・フリシゲンシスを検出する方法である。

- 15 (10) 第10の発明は、(3)または(4)に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドあるいは(6)に記載されたオリゴヌクレオチドと、ベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってベクチネータス・セルビシフィラスを検出する方法である。

(11) 第11の発明は、ベクチネータス・フリシゲンシスの16SrRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、以下の配列、

25 5' - CGTATCCAGAGATGGATATT - 3' ⑥

を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである(9)の方法である。

(12) 第12の発明は、ベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、以下の配列、

5' - CGTATGCAGAGATGCATATT - 3' ⑦

- 30 を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである(10)の方法である。

図面の簡単な説明

図1は実施例3における電気泳動図。

図2は実施例5における電気泳動図。

発明を実施するための最良の形態

- 35 遺伝子増幅に関する技術は既に公知であり、Saikiらが開発したPolymerase Chain Reaction法(以下、PCR法と略す; Science 230,1350,1985)を基に行

うことができる。

この方法は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応で、迅速・高感度で高い特異性を持ち、かつ簡便であることから、遺伝学的分野のみならず、近年は医療分野における病原菌の迅速判定や、食品分野における有害菌の迅速検出にも応用が試みられている。PCR法を行うことにより、検体中に僅かな量しか存在していなくても、2つのプライマーが挟む標的ヌクレオチド配列は何百倍にも増幅され、検出が可能までに大量にそのコピーが産生される。また、PCR法を行うには、検体中に存在する菌から核酸成分を遊離させる必要があるが、PCR法は標的配列が数分子以上存在すれば増幅反応が進むので、溶菌酵素や界面活性剤を用いた簡便な前処理をするだけで十分に試験に供することができる。そのため、従来の細菌検出法に比べ、利用価値が非常に高い。

これらのことを利用すべく、本発明では、ベクチネータス・フリシゲンシス、ベクチネータス・セルビシフィラス各々の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列を提供し、これらから選択したオリゴヌクレオチドもしくは16SrRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列をPCR法の核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって検体中にベクチネータス・フリシゲンシスあるいはベクチネータス・セルビシフィラスが存在するか否かを迅速・高感度に判定する方法を開発した。

検体は、ビール及びビール製造途中の半製品、または下水などの環境から採取されたサンプルでもよい。また、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは化学合成されたものでも天然のものでも、いずれの使用でも可能である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、PCR法を用いて、ベクチネータス・フリシゲンシスあるいはベクチネータス・セルビシフィラスを検出する方法を示す。PCR法に用いた塩基配列は、さきの(5)、(6)、(11)、(12)に示したものは一例であり、これに限定されるものではない。また、PCR法に用いるプライマー長は、(5)、(6)、(11)、(12)に記述したものは19～20塩基長であったが、これに限定されるものではない。好ましくは、10～50塩基長のものを用いる。

PCR法を用いてベクチネータス・フリシゲンシスを検出する場合、プライマーとして①と⑥を組み合わせた場合の増幅されるDNA断片はおよそ700塩基対およびおよそ900塩基対、②と⑥を組み合わせ場合の増幅されるDNA断片はおよそ700塩基対およびおよそ900塩基対であり、これらのバンドがゲル電気泳動により検出されときはベクチネータス・フリシゲンシスが存在していたと判定できる。これらのプライマーの組み合わせは、いずれでもベクチネータス・フリシゲンシス菌に特異的であるため、この菌種の検出に利用で



きるが、2組を平行して使用することにより、より確実な同定が行える。PCR法に用いるプライマーの塩基配列を変更させることで、増幅されるヌクレオチド配列の長さは変化する。

- 5 一方、PCR法を用いてベクチネータス・セルビシフィラスを検出する場合、  
プライマーとして③と⑦を組み合わせた場合の増幅されるDNA断片はおよそ  
600塩基対、④と⑦を組み合わせた場合の増幅されるDNA断片はおよそ65  
0塩基対、⑤と⑦を組み合わせた場合の増幅されるDNA断片はおよそ700  
塩基対であり、これらのバンドがゲル電気泳動により検出されときはベクチネー  
10 5 タス・セルビシフィラスが存在していたと判定できる。これらのプライマーの組  
み合わせは、いずれでもベクチネータス・セルビシフィラス菌に特異的であるた  
め、この菌種の検出に利用できるが、2組以上を平行して使用することにより、  
より確実な同定が行える。PCR法に用いるプライマーの塩基配列を変更させる  
ことで、増幅されるヌクレオチド配列の長さは変化する。

- PCR反応における温度条件は、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応で  
15 90～98℃、プライマー鋳型DNAにハイブリダイズさせるアニーリング反  
応で37～65℃、DNAポリメラーゼを作用させる鎖長反応で50～75℃  
で行い、これを1サイクルとしたものを数十サイクル行わせることにより、標的  
配列を増幅させることができる。PCR反応後、反応物を電気泳動により分離し、  
エチジウムブロマイド等で核酸染色を行い、増幅されたヌクレオチド配列の塩基  
20 長が、上述の標的配列の塩基長と等しければ検体中に検出対象の菌が存在すると  
判定できる。増幅されたヌクレオチド配列の検出には、クロマトグラフィーも有  
効である。

本発明の配列表について説明する。

- 25 配列番号1は、配列の長さが624、配列の型が核酸、鎖の数が二本鎖、ト  
ポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がベクチネータス・フ  
リシンゲンシス DSM6306の配列である。

配列番号2は、配列の長さが442、配列の型が核酸、鎖の数が二本鎖、ト  
ポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がベクチネータス・フ  
リシンゲンシス DSM6306の配列である。

- 30 配列番号3は、配列の長さが724、配列の型が核酸、鎖の数が二本鎖、ト  
ポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がベクチネータス・セ  
ルビシフィラス DSM20467の配列である。

- 配列番号4は、配列の長さが399、配列の型が核酸、鎖の数が二本鎖、ト  
ポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がベクチネータス・セ  
35 ルビシフィラス DSM20467の配列である。

配列番号5は、配列の長さが19、配列の型が核酸、鎖の数が一本鎖、トポ

ロジーが直鎖状、配列の種類が genomic DNA。起源がベクチネータス・フリ  
シンゲンシス DSM6306 の配列である。

配列番号 6 は、配列の長さが 20、配列の型が核酸、鎖の数が一本鎖、トボ  
ロジーが直鎖状、配列の種類が genomic DNA。起源がベクチネータス・フリ

5 シンゲンシス DSM6306 の配列である。

配列番号 7 は、配列の長さが 19、配列の型が核酸、鎖の数が一本鎖、トボ  
ロジーが直鎖状、配列の種類が genomic DNA。起源がベクチネータス・セル  
ビシフィラス DSM20467 の配列である。

10 配列番号 8 は、配列の長さが 20、配列の型が核酸、鎖の数が一本鎖、トボ  
ロジーが直鎖状、配列の種類が genomic DNA。起源がベクチネータス・セル  
ビシフィラス DSM20467 の配列である。

配列番号 9 は、配列の長さが 20、配列の型が核酸、鎖の数が一本鎖、トボ  
ロジーが直鎖状、配列の種類が genomic DNA。起源がベクチネータス・セル  
ビシフィラス DSM20467 の配列である。

15 配列番号 10 は、配列の長さが 20、配列の型が核酸、鎖の数が一本鎖、ト  
ボロジーが直鎖状、配列の種類が genomic DNA。起源がベクチネータス・フ  
リシンゲンシス DSM6306 の配列である。

配列番号 11 は、配列の長さが 20、配列の型が核酸、鎖の数が一本鎖、ト  
ボロジーが直鎖状、配列の種類が genomic DNA。起源がベクチネータス・セ  
20 ルビシフィラス DSM20467 の配列である。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施  
例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### 検体の調製

25 *Pectinatus* 属に属する菌としては、*Pectinatus frisingensis* (DSM6306)、  
*Pectinatus cerevisiiphilus* (DSM20467) を使用した。また、本発明の配列番号  
5、6、7、8、9、10、11 に示したベクチネータス・フリシンゲンシスお  
よびベクチネータス・セルビシフィラスプライマーの特異性を確かめるために、  
表 1 に示す他の細菌を使用した。これらを適当な増殖用培地にて培養を行った後、  
30 菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からの DNA 抽出は、新生化学実  
験講座 2 核酸 I 分離精製 p20~21 (日本生化学会編、東京化学同人) に従って  
行い、DNA 溶液を得た。

##### 表 1

菌番号	菌種	菌株名	備考
1	<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM6306	type strain
2	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM20467	type strain
3	<i>Selenomonas lacticifex</i>	DSM20757	type strain
4	<i>Zymophilus raffinivorans</i>	DSM20765	type strain
5	<i>Zymophilus paucivorans</i>	DSM20756	type strain
6	<i>Escherichia coli</i>	IF03301	K-12
7	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM20462	type strain
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IF013951	type strain
9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	type strain
10	<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	type strain
11	<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	type strain
12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	JCM6124	type strain
13	<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	type strain

### 実施例 2

ペクチネータス・フリシングェンシスの 16 S rRNA をコードする遺伝子と  
23 S rRNA をコードする遺伝子との間のスペーサー領域のクローニング及び

#### 5 塩基配列の決定

(1) PCR 法による 16 S / 23 S rRNA スペーサー領域の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーの選定および合成  
ペクチネータス・フリシングェンシスの 16 S リボソーム RNA 遺伝子は塩基配列

が明らかにされており〔インターナショナル ジャーナル オブ システマティック バクテリオロジー(International Journal of Systematic Bacteriology)、第40巻、第19~27頁(1990)〕、557番目~576番目の塩基配列をもとにプライマーを選定した。

- 5      ベクチネータス・フリシゲンシスの23SリボソームRNA遺伝子は塩基配列が明らかにされており〔システマティック アプライド マイクロバイオロジー(Systematic Applied Microbiology)、第15巻、第487~501頁(1992)、EMBL Accession number X48423〕、1番目~20番目の塩基配列をもとに対応する相補的配列になるようにプライマーを選定した。合成はサフディーテクノロジー(株)に委託した。

- 10      (2) PCR法による16S/23SrRNAスパーサー領域の増幅  
実施例1で調製したベクチネータス・フリシゲンシスのDNA溶液0.1  $\mu$ gを0.2ml用チューブ(パーキンエルマー社)に取り、rTaq DNA Polymerase Kit(東洋紡社)中の10×バッファーを5  $\mu$ l、  
15      3  $\mu$ lの25mM MgCl<sub>2</sub>、5  $\mu$ lの2mMdNTP混合液(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、0.5  $\mu$ lの5ユニット/ $\mu$ lのタック-ポリメラーゼ、実施例2-(1)で調製した濃度100mMプライマーを各々0.5  $\mu$ lを加え、これに滅菌蒸留水を加えて50  $\mu$ lの溶液にした。このチューブを自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー(パーキンエルマー社)にセットし増幅  
20      反応を行った。反応条件は、94℃、2.5分間の変性後、94℃、30秒間の変性→55℃、30秒間のプライマーのアニーリング→72℃、30秒間の合成反応のサイクルを30サイクル行った。反応後5  $\mu$ lの反応液を取り、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その結果、約1600bp(以下「ロング」と称す)と  
25      約1400bp(以下「ショート」と称す)のDNAが増幅された。

- (3) スパーサー領域ロングのクローニング及びシーケンシング  
PCR終了後の反応液を、ハイピュアPCRプロダクトピュリフィケーションキット(ベリンガーマンハイム社)を用い、未反応のdNTPsを除去した。このように調製した増幅DNA100ngにTAクローニングキット  
30      (INVITROGEN社)に含まれるプラスミドpCR2.1を2  $\mu$ l、リガーゼを1  $\mu$ l、バッファーを1  $\mu$ l、滅菌水を全量10  $\mu$ lになるように加え、14℃、4時間反応させた後、その2  $\mu$ lと0.5M  $\beta$ -メルカプトエタノール2  $\mu$ lをともに大腸菌INV $\alpha$ Fコンピテントセルに加え、氷中、30分間放置した後、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。  
35      形質転換した大腸菌にSOC培地(2.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10.0mM NaCl, 2.5mM KCl, 1

- 0.0mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 20.0mM glucose) 250 $\mu$ l  
を加え、37°C、60分間振とうした後、50 $\mu$ g/mlアンピシリンおよび  
40 $\mu$ g/ml X-Galを含むLB平板培地に植菌し、37°C、一晚培養し  
た。現れた白色のコロニーを50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含む3mlのLB  
5 液体培地に接種し、37°C、一晚培養した。
- 培養後、大腸菌よりプラスミド ミニ キット (QIAGEN社) を用いて、  
プラスミドを抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素 *EcoRI*  
(宝酒造社) により37°C、60分間反応させた後アガロース電気泳動、エチ  
ジウムブロマイドによるDNAの染色により、ロングが挿入されていることを確  
10 認した。残りのプラスミドのうち500ngを制限酵素 *SmaI* (東洋紡社) に  
より、30°C、60分間反応させた後、3M 酢酸ナトリウム2 $\mu$ l、100%  
エタノールを500 $\mu$ lを加え、氷中に15分間保持した後、15000rpm、  
15分間遠心し、上清を除いた。沈殿に70%エタノールを500 $\mu$ lを加え、  
15000rpm、15分間遠心し、上清を除き、10分間減圧乾燥を行った。  
15 この沈殿に滅菌水を加えて溶解し、制限酵素 *XbaI* (ベーリンガーマンハイム  
社) により、37°C、60分間反応させた。この反応液に等量のフェノール/  
クロロホルム (等量混合液) を加え穏やかに混合し、15000rpm、15分  
間遠心し水層 (上層) を回収した。
- この回収液に等量の水飽和エーテルを加え穏やかに混合し、15000rp  
20 m、15分間遠心しエーテル層 (上層) を除去した。残りの水層に3M 酢酸ナ  
トリウム2 $\mu$ l、100%エタノールを500 $\mu$ lを加え、氷中に15分間保持  
した後、15000rpm、15分間遠心し、上清を除いた。沈殿に70%エタ  
ノールを500 $\mu$ l加え、15000rpm、15分間遠心し、上清を除き、1  
0分間減圧乾燥を行った後、滅菌蒸留水20 $\mu$ lを加えた。この溶液5 $\mu$ lにブ  
25 ランティングキット (宝酒造社) に含まれる10 $\times$ バッファーを1 $\mu$ l、滅菌蒸  
留水を3 $\mu$ lを加え、70°Cで5分間保温した後、T4 DNA ポリメラーゼ  
1 $\mu$ lを加え、37°C、5分間保温することにより、末端平滑化を行った。攪拌  
によりT4 DNA ポリメラーゼを失活させた後、Ligation Sol  
ution Aを40 $\mu$ l、Ligation Solution Bを10 $\mu$   
30 l加え、16°Cで30分間保温することにより分子内ライゲーションを行った。
- この反応液2 $\mu$ lと0.5M  $\beta$ -メルカプトエタノール2 $\mu$ lとともに大腸  
菌 INV $\alpha$ F コンピテントセルに加え、氷中、30分間放置した後、42°C、30  
秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌  
にSOC培地 (2.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extr  
35 act, 10.0mM NaCl, 2.5mM KCl, 10.0mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 20.0mM glucose) 250 $\mu$ lを加え、37°C、6

- 0分間振とうした後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB平板培地に植菌し、 $37^\circ\text{C}$ 、一晚培養した。現れた白色のコロニーを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む $3\text{ml}$ のLB液体培地に接種し、 $37^\circ\text{C}$ 、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミドミニキット (QIAGEN社) を用いて、プラスミドを抽出した。
- 5 このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応を行った。シーケンシングプライマーはIRD41 Infared Dye Labeled M13 Forward プライマーおよびIRD41 Infared Dye Labeled M13 Reverse プライマー (日清紡製造、アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標) Cycle Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES 社製) を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA Sequencing System (LI-COR 社製) を用いた。
- 10 得られた *Pectinatus frisingensis* DSM6306 菌の16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域 (ロング) の遺伝子配列を配列番号1に示す。
- 15 (4) スペーサー領域ショートのコローニング及びシーケンシング  
実施例2-(2)のPCR終了後の反応液を、ハイビュアPCRプロダクトピュリフィケーションキット (ベーリンガー・マンハイム社) を用い、未反応のdNTPsを除去した。このように調製した増幅DNA $100\text{ng}$ にTAKARA クローニングキット (INVITROGEN社) に含まれるプラスミドpCR2.1を $2\mu\text{l}$ 、リガーゼを $1\mu\text{l}$ 、バッファーを $1\mu\text{l}$ 、滅菌水を全量 $10\mu\text{l}$ になるように加え、 $14^\circ\text{C}$ 、4時間反応させた後、その $2\mu\text{l}$ と $0.5\text{M}$   $\beta$ -メルカプトエタノール $2\mu\text{l}$ をともに大腸菌INV $\alpha$ Fコンピテントセルに加え、氷中、30分間放置した後、 $42^\circ\text{C}$ 、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地 ( $2.0\%$  Tryptone,  $0.5\%$  Yeast Extract,  $10.0\text{mM}$  NaCl,  $2.5\text{mM}$  KCl,  $10.0\text{mM}$   $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $20.0\text{mM}$  glucose)  $250\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、60分間振とうした後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンおよび $40\mu\text{g}/\text{ml}$  X-Galを含むLB平板培地に植菌し、 $37^\circ\text{C}$ 、一晚培養した。現れた白色のコロニーを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む $3\text{ml}$ のLB液体培地に接種し、 $37^\circ\text{C}$ 、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミドミニキット (QIAGEN社) を用いて、プラスミドを抽出した。
- 25 得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoRI (宝酒造社) により  
37 $^\circ\text{C}$ 、60分間反応させた後アガロース電気泳動、エチジウムブロマイドによるDNAの染色により、ショートが挿入されていることを確認した。残りのプ
- 30

- ラスミドのうち500 ngを制限酵素 *Sma* I (東洋紡社) により、30℃、60分間反応させた後、3M 酢酸ナトリウム2 μl、100%エタノールを500 μlを加え、氷中に15分間保持した後、15000 rpm、15分間遠心し、上清を除いた。沈殿に70%エタノールを500 μlを加え、15000 rpm、15分間遠心し、上清を除き、10分間減圧乾燥を行った。この沈殿に滅菌水を加えて溶解し、制限酵素 *Xba* I (ベーリンガーマンハイム社) により、37℃、60分間反応させた。この反応液に等量のフェノール/クロロホルム(等量混合液)を加え穏やかに混合し、15000 rpm、15分間遠心し水層(上層)を回収した。この回収液に等量の水飽和エーテルを加え穏やかに混合し、15000 rpm、15分間遠心しエーテル層(上層)を除去した。
- 10 残りの水層に3M 酢酸ナトリウム2 μl、100%エタノールを500 μlを加え、氷中に15分間保持した後、15000 rpm、15分間遠心し、上清を除いた。沈殿に70%エタノールを500 μl加え、15000 rpm、15分間遠心し、上清を除き、10分間減圧乾燥を行った後、滅菌蒸留水20 μlを加えた。この溶液5 μlにブランチングキット(宝酒造社)に含まれる10×バッファーを1 μl、滅菌蒸留水を全量3 μlを加え、70℃で5分間保温した後、T4 DNA ポリメラーゼ1 μlを加え、37℃、5分間保温することにより、末端平滑化を行った。攪拌によりT4 DNA ポリメラーゼを失活させた後、Ligation Solution Aを40 μl、Ligation Solution Bを10 μl加え、16℃で30分間保温することにより分子内ライゲーションを行った。この反応液2 μlと0.5M β-メルカプトエタノール2 μlをともに大腸菌 INVαF コンピテントセルに加え、氷中、30分間放置した後、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。
- 25 形質転換した大腸菌にSOC培地(2.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10.0mM NaCl, 2.5mM KCl, 10.0mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20.0mM glucose) 250 μlを加え、37℃、60分間振とうした後、50 μg/mlアンピシリンを含むLB平板培地に植菌し、37℃、一晚培養した。現れた白色のコロニーを50 μg/mlアンピシリンを含む3 mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミド ミニ キット(QIAGEN社)を用いて、プラスミドを抽出した。
- 30 このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応を行った。シーケンシングプライマーはIRD41 Infared Dye Labeled M13 Forward プライマーおよびIRD41 Infared Dye Labeled M13 Reverse プライマー(日清紡製造、アロカ(株)販売)を、反応液はSequiTherm(登録商標) Long-Read(登録商標)

Cycle Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES 社製) を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA Sequencing System (LI-COR 社製) を用いた。

- 5 得られたベクチネータス・フリシンゲンシスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域(ショート)の遺伝子配列を配列番号2に示す。

### 実施例3

PCR法によるベクチネータス・フリシンゲンシスの検出

- 10 (1) ベクチネータス・フリシンゲンシスのためのプライマーの選定と合成  
配列番号1、2を基にDNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング(株))を用いてベクチネータス・フリシンゲンシスに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号1のベクチネータス・フリシンゲンシスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列上の377番目から395番目までの配列、および配列番号2のベクチネータス・フリシンゲンシスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列上の195番目から213番目までの配列を選定した。(配列番号5)

- 20 また、同様の解析により、配列番号1のベクチネータス・フリシンゲンシスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列上の361番目から380番目までの配列、および配列番号2のベクチネータス・フリシンゲンシスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列上の179番目から198番目までの配列を選定した。(配列番号6)

- 25 さらにベクチネータス・フリシンゲンシスの16SrRNAをコードする遺伝子配列より、配列番号10に示す特異的プライマーを選定した。

これらのオリゴヌクレオチドを実施例2-(1)と同様の方法で化学合成した。  
(2) 配列番号6および配列番号10の配列をもつプライマーを用いたベクチネータス・フリシンゲンシスの検出及び同定。

- 30 実施例1で調製した各菌のDNA溶液を、実施例3で合成したプライマー(配列番号6および配列番号10)を用いてPCRを行った。PCRは以下の温度条件:

熱変性; 94°C 30秒

アニーリング; 55°C 30秒

鎖長反応; 72°C 30秒

- 35 を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返して行った。PCR終了後、反応液をアガロースゲルにて、100V定電圧で30分間電気泳動に供した。反応液



の他に、分子量マーカーとしてpHYマーカーも同時に泳動した。泳動終了後、約0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイド溶液中で20分間染色した後、紫外線照射下でゲルを観察し、写真撮影を行った。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を分子量マーカーとの相対移動度から求めた。

5     その結果、図1に示されるように、ベクチネータス・フリシンゲンシスにのみおよそ700bpsとおよそ900bpsのバンドが検出された。

この結果より、本発明の配列番号6及び配列番号10のオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして用いた場合、ベクチネータス・フリシンゲンシスにのみ目的長のバンドが検出された。このことより、本発明の各オリゴヌクレオチドが、  
10     ベクチネータス・フリシンゲンシスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列および16SrRNAをコードする遺伝子上の標的とする塩基配列を正しく認識していることが示された。かつ、同属のベクチネータス・セルビシフィラスを始め、近縁な偏性嫌気性菌やグラム陽性菌にも目的長のバンドは一切検出されなかったことから、  
15     本発明は、ベクチネータス・フリシンゲンシスを種特異的に検出できることを示し、ベクチネータス・フリシンゲンシスを検出できると同時に同定も行うことが出来るものであることが示された。

#### 実施例4

ベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域のクローニング及び塩基配列の決定

(1) PCR法による16S/23SrRNAスペーサー領域の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーの選定および合成

ベクチネータス・セルビシフィラスの16SリボソームRNA遺伝子は塩基配列が明らかにされており〔インターナショナル ジャーナル オブ システマティック バクテリオロジー(International Journal of Systematic Bacteriology)、  
25     第40巻、第19～27頁(1990)〕、557番目～576番目の塩基配列をもとにプライマーを選定した。

ベクチネータス・セルビシフィラスの23リボソームRNA遺伝子は塩基配列が明らかにされていないが、ベクチネータス・フリシンゲンシスの23リボソームRNA遺伝子は塩基配列が明らかにされていることから〔システマティック アプライド マイクロバイオロジー(Systematic Applied Microbiology)、第15巻、第487～501頁(1992)、EMBL Accession number X48423〕、ベクチネータス・フリシンゲンシスの23リボソームRNA遺伝子の1番目～20番目の塩基配列をもとに対応する相補的配列になるよう  
30     にプライマーを選定した。合成はサワディーテクノロジー(株)に委託した。

## (2) PCR法による16S/23SrRNAスペーサー領域の増幅

実施例1で調製したベクチネータス・セルビシフィラスのDNA溶液0.1  
μgを0.2ml用チューブ(パーキンエルマー社)に取り、rTaq DNA  
A Polymerase Kit(東洋紡社)中の10×バッファーを5μl、  
5 3μlの25mM MgCl<sub>2</sub>、5μlの2mM dNTP混合液(dATP、dG  
TP、dCTP、dTTP)、0.5μlの5ユニット/μlのタッカーポリメ  
ラーゼ、実施例2-(1)で調製した濃度100mMプライマーを各々0.5  
μlを加え、これに滅菌蒸留水を加えて50μlの溶液にした。このチューブを  
自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー(パーキンエルマー社)にセットし増幅  
10 反応を行った。反応条件は、94℃、2.5分間の変性後、94℃、30秒間  
の変性→55℃、30秒間のプライマーのアニーリング→72℃、30秒間の  
合成反応のサイクルを30サイクル行った。反応後5μlの反応液を取り、アガ  
ロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅さ  
れたDNAを確認した。その結果、約1700bp(以下「ロング」と称す)と  
15 約1400bp(以下「ショート」と称す)のDNAが増幅された。

## (3) スペーサー領域ロングのクローニング及びシーケンシング

PCR終了後の反応液を、ハイピュアPCRプロダクトピュリフィ  
ケーションキット(ベリンガー・マンハイム社)を用い、未反応のdNTPsを除  
去した。このように調製した増幅DNA100ngにTAクローニングキッ  
20 ト(INVITROGEN社)に含まれるプラスミドpCR2.1を2μl、リ  
ガーゼを1μl、バッファーを1μl、滅菌水を全量10μlになるように加え、  
14℃、4時間反応させた後、その2μlと0.5M β-メルカプトエタノー  
ル2μlとともに大腸菌INVαFコンピテントセルに加え、氷中、30分間放置  
した後、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行っ  
25 た。形質転換した大腸菌にSOC培地(2.0% Tryptone, 0.5% Y  
east Extract, 10.0mM NaCl, 2.5mM KCl, 1  
0.0mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20.0mM glucose)250μl  
を加え、37℃、60分間振とうした後、50μg/mlアンピシリンおよび  
40μg/ml X-Galを含むLB平板培地に植菌し、37℃、一晚培養し  
30 た。現れた白色のコロニーを50μg/mlアンピシリンを含む3mlのLB  
液体培地に接種し、37℃、一晚培養した。

培養後、大腸菌よりプラスミドミニキット(QIAGEN社)を用いて、  
プラスミドを抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoRI  
(宝酒造社)により37℃、60分間反応させた後アガロース電気泳動、エチ  
35 ジウムブロマイドによるDNAの染色により、ロングが挿入されていることを確  
認した。残りのプラスミドのうち500ngを制限酵素SmaI(東洋紡社)に

- より、30℃、60分間反応させた後、3M 酢酸ナトリウム2μl、100%  
エタノールを500μlを加え、氷中に15分間保持した後、15000rpm、  
15分間遠心し、上清を除いた。沈殿に70%エタノールを500μlを加え、  
15000rpm、15分間遠心し、上清を除き、10分間減圧乾燥を行った。
- 5 この沈殿に滅菌水を加えて溶解し、制限酵素 *Xba*I (ペーリンガーマンハイム社) により、37℃、60分間反応させた。この反応液に等量のフェノール/  
クロロホルム (等量混合液) を加え穏やかに混合し、15000rpm、15分  
間遠心し水層 (上層) を回収した。この回収液に等量の水飽和エーテルを加え穏  
やかに混合し、15000rpm、15分間遠心しエーテル層 (上層) を除去し  
10 た。残りの水層に3M 酢酸ナトリウム2μl、100%エタノールを500μl  
を加え、氷中に15分間保持した後、15000rpm、15分間遠心し、上清  
を除いた。
- 沈殿に70%エタノールを500μl加え、15000rpm、15分間遠心  
し、上清を除き、10分間減圧乾燥を行った後、滅菌蒸留水20μlを加えた。
- 15 この溶液5μlにブランディングキット (宝酒造社) に含まれる10×バッファ  
ーを1μl、滅菌蒸留水を3μlを加え、70℃で5分間保温した後、T4 D  
NA ポリメラーゼ1μlを加え、37℃、5分間保温することにより、末端平  
滑化を行った。攪拌によりT4 DNA ポリメラーゼを失活させた後、Lig  
20 ation Solution Aを40μl、Ligation Solut  
ion Bを10μl加え、16℃で30分間保温することにより分子内ライゲ  
ーションを行った。この反応液2μlと0.5M β-メルカプトエタノール2  
μlをともに大腸菌 INVαF コンピテントセルに加え、氷中、30分間放置した  
後、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。
- 形質転換した大腸菌にSOC培地 (2.0% Tryptone, 0.5% Y  
25 east Extract, 10.0mM NaCl, 2.5mM KCl, 1  
0.0mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20.0mM glucose) 250μl  
を加え、37℃、60分間振とうした後、50μg/mlアンピシリンを含む  
LB平板培地に植菌し、37℃、一晚培養した。現れた白色のコロニーを50  
μg/mlアンピシリンを含む3mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晚  
30 培養した。培養後、大腸菌よりプラスミド ミニ キット (QIAGEN社) を  
用いて、プラスミドを抽出した。
- このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応を行った。シ  
ーケンシングプライマーはIRD41 Infared Dye Labeled M13 Forward プライマ  
ーおよびIRD41 Infared Dye Labeled M13 Reverse プライマー (日清紡製造、  
35 アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標)  
Cycle Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES 社製) を使用した。塩基配

列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA Sequencing System (LI-COR 社製) を用いた。

得られたベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域(ロング)の遺伝子配列を配列番号3に示す。

(4) スパーサー領域ショートのコローニング及びシーケンシング

実施例4-(2)のPCR終了後の反応液を、ハイピュアPCRプロダクトピュリフィケーションキット(ベリンガーマンハイム社)を用い、未反応のdNTPsを除去した。このように調製した増幅DNA100ngにTAKA クローニングキット(INVITROGEN社)に含まれるプラスミドpCR2.1を2 $\mu$ l、リガーゼを1 $\mu$ l、バッファーを1 $\mu$ l、滅菌水を全量10 $\mu$ lになるように加え、14 $^{\circ}$ C、4時間反応させた後、その2 $\mu$ lと0.5M  $\beta$ -メルカプトエタノール2 $\mu$ lとともに大腸菌INV $\alpha$ Fコンピテントセルに加え、水中、30分間放置した後、42 $^{\circ}$ C、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地(2.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10.0mM NaCl, 2.5mM KCl, 10.0mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 20.0mM glucose) 250 $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ C、60分間振とうした後、50 $\mu$ g/mlアンピシリンおよび40 $\mu$ g/ml X-Galを含むLB平板培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C、一晚培養した。現れた白色のコロニーを50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含む3mlのLB液体培地に接種し、37 $^{\circ}$ C、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミドキット(QIAGEN社)を用いて、プラスミドを抽出した。

得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoRI(宝酒造社)により37 $^{\circ}$ C、60分間反応させた後アガロース電気泳動、エチジウムブロマイドによるDNAの染色により、ショートが挿入されていることを確認した。残りのプラスミドのうち500ngを制限酵素SmaI(東洋紡社)により、30 $^{\circ}$ C、60分間反応させた後、3M 酢酸ナトリウム2 $\mu$ l、100%エタノールを500 $\mu$ lを加え、水中に15分間保持した後、15000rpm、15分間遠心し、上清を除いた。沈殿に70%エタノールを500 $\mu$ lを加え、15000rpm、15分間遠心し、上清を除き、10分間減圧乾燥を行った。この沈殿に滅菌水を加えて溶解し、制限酵素BamHI(宝酒造社)により、37 $^{\circ}$ C、60分間反応させた。この反応液に等量のフェノール/クロロホルム(等量混合液)を加え穏やかに混合し、15000rpm、15分間遠心し水層(上層)を回収した。この回収液に等量の水飽和エーテルを加え穏やかに混合し、15000rpm、15分間遠心しエーテル層(上層)を除去した。残りの水層に3M 酢酸

ナトリウム 2  $\mu$ l、100%エタノールを 500  $\mu$ l を加え、氷中に 15 分間保持した後、15000 rpm、15 分間遠心し、上清を除いた。

- 沈殿に 70%エタノールを 500  $\mu$ l 加え、15000 rpm、15 分間遠心し、上清を除き、10 分間減圧乾燥を行った後、滅菌蒸留水 20  $\mu$ l を加えた。
- 5 この溶液 5  $\mu$ l にブランディングキット（宝酒造社）に含まれる 10 $\times$ バッファを 1  $\mu$ l、滅菌蒸留水を全量 3  $\mu$ l を加え、70°C で 5 分間保温した後、T4 DNA ポリメラーゼ 1  $\mu$ l を加え、37°C、5 分間保温することにより、末端平滑化を行った。攪拌により T4 DNA ポリメラーゼを失活させた後、Ligation Solution A を 40  $\mu$ l、Ligation Solution B を 10  $\mu$ l 加え、16°C で 30 分間保温することにより分子内ライゲーションを行った。この反応液 2  $\mu$ l と 0.5 M  $\beta$ -メルカプトエタノール 2
- 10  $\mu$ l をともに大腸菌 INV $\alpha$ F コンピテントセルに加え、氷中、30 分間放置した後、42°C、30 秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌に SOC 培地（2.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1
- 15 0.0 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20.0 mM glucose）250  $\mu$ l を加え、37°C、60 分間振とうした後、50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 平板培地に植菌し、37°C、一晚培養した。現れた白色のコロニーを 50
- 20  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む 3 ml の LB 液体培地に接種し、37°C、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミド キット（QIAGEN 社）を用いて、プラスミドを抽出した。

- このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応を行った。シーケンスプライマーは IRD41 Infared Dye Labeled M13 Forward プライマーおよび IRD41 Infared Dye Labeled M13 Reverse プライマー（日清紡製造、
- 25 アロカ（株）販売）を、反応液は SequiTherm（登録商標）Long-Read（登録商標）Cycle Sequencing Kit-LC（EPICENTRE TECHNOLOGIES 社製）を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR（登録商標）DNA Sequencing System（LI-COR 社製）を用いた。

- 得られたベクリネータス・セルビシフィラスの 16S rRNA をコードする遺伝子と 23S rRNA をコードする遺伝子の間のスペーサー領域（ショート）の遺伝子配列を配列番号 4 に示す。
- 30

#### 実施例 5

PCR 法によるベクチネータス・セルビシフィラスの検出

- （1）ベクチネータス・セルビシフィラスのためのプライマーの選定と合成
- 35 配列番号 3 を基に DNASIS（日立ソフトウェアエンジニアリング（株））を用いてベクチネータス・セルビシフィラスに特異的な配列を解析した。その結

果、配列番号3のベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列上の135番目から153番目までの配列を選定した。(配列番号7)

5 また、同様の解析により、配列番号3のベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列上の172番目から191番目までの配列を選定した。(配列番号8)

10 また、同様の解析により、配列番号3のベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列上の203番目から222番目までの配列を選定した。(配列番号9)

さらにベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNAをコードする遺伝子配列より、配列番号11に示す特異的プライマーを選定した。これらのオリゴヌクレオチドを実施例2-(1)と同様の方法で化学合成した。

15 (2) 配列番号7および配列番号11の配列をもつプライマーを用いたベクチネータス・セルビシフィラスの検出及び同定。

実施例1で調製した各菌のDNA溶液を、実施例5-(1)で合成したプライマー(配列番号7および配列番号11)を用いてPCRを行った。PCRは以下の温度条件:

20 熱変性; 94°C 30秒

アニーリング; 55°C 30秒

鎖長反応; 72°C 30秒

25 を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返して行った。PCR終了後、反応液をアガロースゲルにて、100V定電圧で30分間電気泳動に供した。反応液の他に、分子量マーカーとしてpHYマーカーも同時に泳動した。泳動終了後、約0.5μg/mlのエチジウムブロマイド溶液中で20分間染色した後、紫外線照射下でゲルを観察し、写真撮影を行った。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を分子量マーカーとの相対移動度から求めた。

30 その結果、図2に示されるように、ベクチネータス・セルビシフィラスにのみ約600bpsのバンドが検出された。

この結果より、本発明の配列番号7及び配列番号11のオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして用いた場合、ベクチネータス・セルビシフィラスにのみ目的長のバンドが検出された。このことより、本発明の各オリゴヌクレオチドが、ベクチネータス・セルビシフィラスの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスパーサー領域の遺伝子配列および16SrRNAをコードする遺伝子上の標的とする塩基配列を正しく認識していること

が示された。かつ、同属のベクチネータス・フリシンゲンシスを始め、近縁な偏性嫌気性菌やグラム陽性菌にも目的長のバンドは一切検出されなかったことから、本発明は、ベクチネータス・セルビシフィラスを種特異的に検出できることを示し、ベクチネータス・セルビシフィラスを検出できると同時に同定も行うことが出来るものであることが示された。

5

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、ベクチネータス・フリシンゲンシスおよびベクチネータス・セルビシフィラスの16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子が明らかになり、この遺伝子配列の全部または一部を用いたベクチネータス・フリシンゲンシスおよびベクチネータス・セルビシフィラス菌を迅速かつ確実に検出する方法が提供された。

10

## 請求の範囲

1. 配列番号 1 に示される塩基配列の一部または全部を含むペクチネータス・フリシゲンシス (*Pectinatus frisingensis*) の 16 S rRNA をコードする遺伝子と 23 S rRNA をコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列。
2. 配列番号 2 に示される塩基配列の一部または全部を含むペクチネータス・フリシゲンシス (*Pectinatus frisingensis*) の 16 S rRNA をコードする遺伝子と 23 S rRNA をコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列。
3. 配列番号 3 に示される塩基配列の一部または全部を含むペクチネータス・セルビシフィラス (*Pectinatus cerevisiiphilus*) の 16 S rRNA をコードする遺伝子と 23 S rRNA をコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列。
4. 配列番号 4 に示される塩基配列の一部または全部を含むペクチネータス・セルビシフィラス (*Pectinatus cerevisiiphilus*) の 16 S rRNA をコードする遺伝子と 23 S rRNA をコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列。
5. ペクチネータス・フリシゲンシス (*Pectinatus frisingensis*) の 16 S rRNA をコードする遺伝子と 23 S rRNA をコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列群、
  - 5' -CCATCCTCTTGAAAATCTC-3' ①
  - 5' -TCTCRTCCTCACAAGTTTGGC-3' ②
 の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。
6. ペクチネータス・セルビシフィラス (*Pectinatus cerevisiiphilus*) の 16 S rRNA をコードする遺伝子と 23 S rRNA をコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列群、
  - 5' -CACTCTTACAAGTATCTAC-3' ③
  - 5' -CCACAATATTTCCGACCAGC-3' ④
  - 5' -AGTCTTCTCTACTGCCATGC-3' ⑤
 の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。
7. 請求項 1 または 2 に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドを核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってペクチネータス・フリシゲンシスを検出する方法。
8. 請求項 3 または 4 に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレ



オチドを核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってベクチネータス・セルビシフィラスを検出する方法。

- 5 9. 請求項1または2に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドあるいは請求項5に記載されたオリゴヌクレオチドと、ベクチネータス・フリシンゲンシスの16S rRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってベクチネータス・フリシンゲンシスを検出する方法。

- 10 10. 請求項3または4に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドあるいは請求項6に記載されたオリゴヌクレオチドと、ベクチネータス・セルビシフィラスの16S rRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってベクチネータス・セルビシフィラスを検出する方法。

11. ベクチネータス・フリシンゲンシスの16S rRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、以下の配列、

- 15 5' -CGTATCCAGAGATGGATATT-3' ⑥  
を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである請求項9記載の方法。

12. ベクチネータス・セルビシフィラスの16S rRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、以下の配列、

- 20 5' -CGTATGCAGAGATGCATATT-3' ⑦  
を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである請求項10記載の方法。

図 1

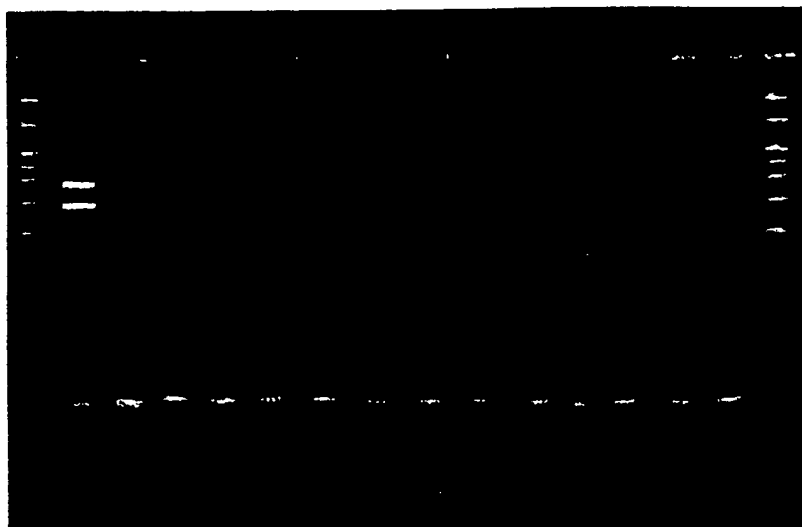
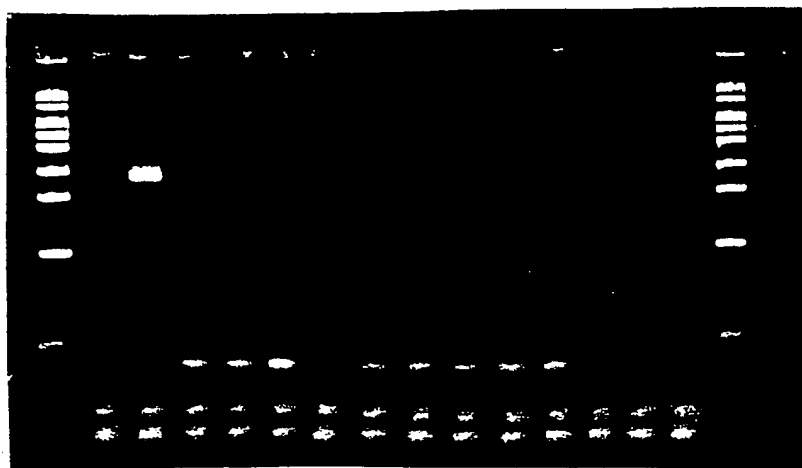


図 2



配列表  
SEQUENCE LISTING

- <110> Asahi Breweries, Ltd.  
 <120> Genes for detecting bacteria and a detection method using them  
 5 <130> 98T3-10  
 <160> 11  
 <210> 1  
 <211> 624  
 <212> DNA  
 10 <213> *Pectinatus frsingensis*  
 <400> 1  
 gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggtgg atcacctcct ttctaaggat 60  
 taaaacaatc cgtcgagcac atccggaaca tgtattgttt ggttttgagg gtttctcct 120  
 caaaaaata gatagaacta atggggcgt agtcagctg ggagagcacc tgccttgcaa 180  
 15 gcagggggtc aggagttcaa atctctcgt ctccaccaga agagaaatgg gcctatagct 240  
 cagctgggta gagcgacgc ctgataagcg tgaggtcagt agttcaagtc tacttaggcc 300  
 caccataatt gcacattgaa aactacacag aagaaaagca aagaacaatt aatcaccaat 360  
 gccaaacttg tgagaggaga ttttcaagag gatggcgggg aatagttgga ccaagcacia 420  
 ttaggaaact aaaaacaagc taagacaaa catataaact taagctaaag gtgatattct 480  
 20 ggaggagact cgagaatata ataaacttac cagaagcgtt cagatgcaag gaagcatgaa 540  
 agcgaatgaa gaaggcgtat tagtatacgc cgatgagtga gctgaaatga tgacgaagca 600  
 gctgagcgtt tatggaaagt ttaa 624  
  
 <210> 2  
 25 <211> 442  
 <212> DNA  
 <213> *Pectinatus frsingensis*  
 <400> 2  
 gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggtgg atcacctcct ttctaaggat 60  
 30 taaaacaatc cgtcgagcac atccggaaca tgtattgttt ggttttgagg gtttctcct 120  
 caaatattgc acattgaaaa ctacacagaa gaaaagcaaa gaacaattaa tcaccaatgc 180  
 caaacttgtg agaagagatt ttcaagagga tggcggggaa tagttggacc aagcacaatt 240

aggaaactaa aaacaagcta agacaaaaca tataaactta agctaaaggt gatattctgg 300  
 aggagactcg agaataataa aaacttacca gaagcgttca gatgcaagga agcatgaaag 360  
 cgaatgaaga aggcgtatta gtatacgccg atgagtgagc tgaaatgatg acgaagcaga 420  
 tgagcgggta tggaaagttt aa 442

5

<210> 3  
 <211> 724  
 <212> DNA  
 <213> *Pectinatus cerevisiiphilus*

10

&lt;400&gt; 3

gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggctgg atcacctcct ttctaaggat 60  
 ttgacaaaaa tctgtcgagt acatccggaa tatgtattgt ttggttttga gggtttctcc 120  
 ctcataaata tatagtagat acttgtaaga gtgtttatgg tatgtttaaa agctggtcgg 180  
 aaatattgtg gtgcaaaaaa atgcatggca gtagagaaga ctggtaaaaa aagaatgaac 240  
 15 taatgggggc gtagctcaga tgggagagca cctgccttgc aagcaggggg tcaggagtgc 300  
 aactctcttc gtctccacca gaagagaaaag ggcctatagc tcagctgggt agagcgcacg 360  
 cctgataagc gtgaggtcag tagttcaagt ctacttaggc ccaccaatat tgcacattga 420  
 aaactacaca gaagaaagca aagaacaatt atcaccaatg ccaaacttgt aagagaaatc 480  
 gaggagagaa tggcggggaa tagttggacc aagcacaat taggaaaaga aacaaacgt 540  
 20 aagaaacaaa catataaact taagcgaaaa ggtgatattc tggaggaaac ttcagagtat 660  
 ataaacttac cagaagcgtt cagatgcgag gaagggcaaa gctgagagaa gaaagcgtat 660  
 taatatacgc tgatgaacga agcaaagcac tgacaaagca gatggatggt tatgggaagt 720  
 taca 724

25

<210> 4  
 <211> 399  
 <212> DNA  
 <213> *Pectinatus cerevisiiphilus*  
 <400> 4

30

gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggctgg atcacctcct ttctaaggat 60  
 ttgacaaaaa tctgtcgagt acatccggaa tatgtattgt ttggttttga gggtttctcc 120

ctcataaata ttgcacattg aaaactacac agaagaaagc aaagaacaat taccaccaat 180  
gccaaacttg taagagaaat cgagaagaga atggcgggga atagttggac caagcacaaa 240  
ttaggaaaag aaacaaacgc taagaacaa acatataaac ttaagcgaaa aggtgatatt 300  
ctggaggaaa cttcagagta tataaactta ccagaagcgt tcagatgcga ggaagggcaa 360  
5 agcactgaca aagtagatgg atggttatgg gaagttaca 399

<210> 5  
<211> 19  
<212> DNA  
10 <213> Pectinatus frisingensis  
<400> 5  
ccatcctctt gaaaatctc 19

<210> 6  
15 <211> 19  
<212> DNA  
<213> Pectinatus frisingensis  
<400> 6  
tctcrtctca caagtttggc 20

20 <210> 7  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Pectinatus cerevisiophilus  
25 <400> 7  
cactcttaca agtatctac 19

<210> 8  
<211> 20  
30 <212> DNA  
<213> Pectinatus cerevisiophilus  
<400> 8  
ccacaatatt tccgaccagc 20

	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Pectinatus cerevisiiphilus	
5	<400> 9	
	agtcttctct actgccatgc	20
	<210> 10	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Pectinatus frisingensis	
	<400> 10	
	cgtatccaga gatggatatt	20
15	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Pectinatus cerevisiiphilus	
	<400> 11	
20	cgtatccaga gatggatatt	20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04341

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LUDWIG, W. et al. "Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of <i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> and description of <i>Pectinatus frisingensis</i> sp. nov., <i>Selenomonas lacticifex</i> sp. nov., <i>Zymophilus raffinosisivorans</i> gen. nov., sp. nov., and <i>Zymophilus paucivorans</i> sp. nov.", International J. of Systematic Bacteriol. (1990) Vol. 40, No. 1, p.19-27	1-12
Y	LUDWIG, W. et al. "Complete 23S ribosomal RNA sequences Of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content", System. Appl. Microbiol. (1992), Vol. 15, No. 4, p.487-501	1-12
Y	JP, 5-504889, A (N. V. Innogenetics S.A.), 29 July, 1993 (29.07.93) &WO, 9116454, A &EP, 525095, A1 &AU, 9177550, A &US, 5536638, A	1-12
Y	JP, 7-51100, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 28 February, 1995 (28.02.95) (Family: none)	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08 November, 1999 (08.11.99)	Date of mailing of the international search report 16 November, 1999 (16.11.99)
-------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04341

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP,6-90793,A(Takara Shuzo Co., Ltd.), 05 April, 1994 (05.04.94) (Family: none)	1-12
Y	JP,6-98800,A(Takara Shuzo Co., Ltd.), 12 April, 1994 (12.04.94) (Family: none)	1-12



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/04341

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),  
CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LUDWIG, W. et al. "Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of <i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> and description of <i>Pectinatus frisingensis</i> sp. nov., <i>Selenomonas lacticifex</i> sp. nov., <i>Zymophilus raffinovorans</i> gen. nov., sp. nov., and <i>Zymophilus paucivorans</i> sp. nov.", International J. of Systematic Bacteriol. (1990) 第40巻, 第1号 p. 19-27	1-12
Y	LUDWIG, W. et al. "Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content", System. Appl. Microbiol. (1992) 第15巻, 第4号 p. 487-501	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.11.99

国際調査報告の発送日

16.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 5-504889, A (エヌ・ベー・イノヘネテイクス・エス・アー) 29. 7月. 1993 (29. 07. 93) &WO, 9116454, A &EP, 525095, A1 &AU, 9177550, A &US, 5536638, A	1-12
Y	JP, 7-51100, A (寶酒造株式会社) 28. 2月. 1995 (28. 02. 95) パテントファミリーなし	1-12
Y	JP, 6-90793, A (寶酒造株式会社) 5. 4月. 1994 (05. 04. 94) パテントファミリーなし	1-12
Y	JP, 6-98800, A (寶酒造株式会社) 12. 4月. 1994 (12. 04. 94) パテントファミリーなし	1-12

(57)要約

本発明は、ビール混濁菌ベクチネータス属菌のベクチネータス・フリシンゲンシスまたはベクチネータス・セルビシフィラスを検出するための遺伝子及びこれを用いた該菌の検出方法に関し、本発明では、ビール混濁に係するベクチネータス属菌に特異的な16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子配列を提供し、その配列を用いて迅速に感度よく検出できる方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CC 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML モリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04341

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.C1<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.C1<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
Genbank/EMBL/DBJ/GenSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LUDWIG, W. et al. "Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of <i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> and description of <i>Pectinatus frisingensis</i> sp. nov., <i>Selenomonas lacticifex</i> sp. nov., <i>Zymophilus raffinosivorans</i> gen. nov., sp. nov., and <i>Zymophilus paucivorans</i> sp. nov.", International J. of Systematic Bacteriol. (1990) Vol. 40, No. 1, p.19-27	1-12
Y	LUDWIG, W. et al. "Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content", System. Appl. Microbiol. (1992), Vol. 15, No. 4, p.487-501	1-12
Y	JP, 5-504889, A (N. V. Innogenetics S.A.), 29 July, 1993 (29.07.93) & WO, 9116454, A & EP, 525095, A1 & AU, 9177550, A & US, 5536638, A	1-12
Y	JP, 7-51100, A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 28 February, 1995 (28.02.95) (Family: none)	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 November, 1999 (08.11.99)

Date of mailing of the international search report  
16 November, 1999 (16.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04341

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP,6-90793,A(Takara Shuzo Co., Ltd.), 05 April, 1994 (05.04.94) (Family: none)	1-12
Y	JP,6-98800,A(Takara Shuzo Co., Ltd.), 12 April, 1994 (12.04.94) (Family: none)	1-12

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/04341

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), CA(STN), REGISTRY(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LUDWIG, W. et al. "Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of <i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> and description of <i>Pectinatus frisingensis</i> sp. nov., <i>Selenomonas lacticifex</i> sp. nov., <i>Zymophilus raffinovorans</i> gen. nov., sp. nov., and <i>Zymophilus paucivorans</i> sp. nov.", International J. of Systematic Bacteriol. (1990) 第40巻, 第1号 p. 19-27	1-12
Y	LUDWIG, W. et al. "Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content", System. Appl. Microbiol. (1992) 第15巻, 第4号 p. 487-501	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 08. 11. 99	国際調査報告の発送日 16.11.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9735

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 5-504889, A (エヌ・ベー・イノヘネテイクス・エス・アー) 29. 7月. 1993 (29. 07. 93) &WO, 9116454, A &EP, 525095, A1 &AU, 9177550, A &US, 5536638, A	1-12
Y	JP, 7-51100, A (寶酒造株式会社) 28. 2月. 1995 (28. 02. 95) パテントファミリーなし	1-12
Y	JP, 6-90793, A (寶酒造株式会社) 5. 4月. 1994 (05. 04. 94) パテントファミリーなし	1-12
Y	JP, 6-98800, A (寶酒造株式会社) 12. 4月. 1994 (12. 04. 94) パテントファミリーなし	1-12